



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1266/79

(51) Int.Cl.⁵ C 07 J 63/00

(22) Indleveringsdag: 28 mar 1979

(41) Alm. tilgængelig: 01 okt 1979

(44) Fremlagt: 16 sep 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 31 mar 1978 JP 38536/78

(71) Ansøger: *OTSUKA PHARMACEUTICAL CO. LTD.; No. 2-9; Kandatsukasa-cho; Chiyoda-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Masanao *Shinohara; JP, Yoshimasa *Nakano; JP, Hirotsugu *Kaise; JP, Taketoshi *Izawa; JP, Wasei *Miyazaki; JP

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af 3-O-(Beta-D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B eller farmaceutisk acceptable salte deraf

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

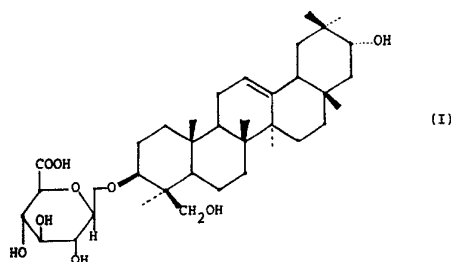
Forbindelsen med formlen (I) fremstilles ved forskellige fremgangsmåder, navnlig ved dyrkning af en mikroorganisme af slægten *Stachybotrys*, specielt *Stachybotrys* sp. T.791, i et næringsmedium indeholdende assimilerbare næringskilder, ved pH fra ca. 3,5 til ca. 11,5 og en temperatur fra ca. 15 til ca. 38°C og udvinning af produktet fra dyrkningsvæsken, eller ved at skille sojasaponin fra sojabønner og behandle det kemisk og/eller fysisk, navnlig ved en alkoholyse og påfølgende hydrolyse eller ved partiel hydrolyse af sojasaponin B.

Forbindelsen med formlen (I) og salte deraf har antikomplementær aktivitet og er anvendelige som terapeutiske midler for autoimmune sygdomme, kollagensygdomme og rheumatiske sygdomme.

1266-79

3-O-(B-D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B, fremgangsmåde til dets fremstilling samt dets anvendelse.

3-O-(B-D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B repræsenteret ved formlen (I)



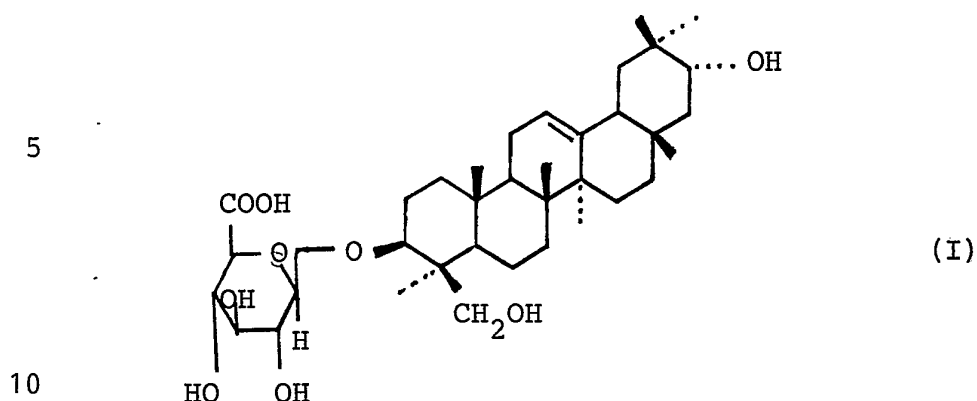
og salte deraf.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af den hidtil ukendte, terapeutisk aktive forbindelse 3-O-(β -D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B med den i krav 1's indledning anførte
5 formel (I) eller farmaceutisk acceptable salte deraf med baser, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen har antikomplementær aktivitet og er anvendelige som te-
10 rapeutiske midler til autoimmune sygdomme, kollagensygdomme og rheumatiske sygdomme.

Der kendes forskellige forbindelser, der er beslægtet med forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen. For eksempel kendes glycyrrhizin (Yasuhiro Ariga, Hiroyuki Sumi, Yumiko Takada og Akikazu Takada, Abridgements of Lecture Programs on Seminar of the Plasmin Research Association, side 65 (1977), og Koretsugu Arimoto, Kaneyuki Mineta, Hiroyuki Sumi, Yumiko Takada og Akikazu Takada, Proceedings of the 14th Symposium on Complements, side 79-82
15 (1977)), samt 3-O-(6-O-methyl- β -D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B (Isao Kitagawa, Masayuki Yoshikawa og Ichiro Yoshioka, Chem. Pharm. Bull., 22, side 1339 (1974), Ibid., 24, side 121 (1976)). Førstnævnte forbindelse har en steroidlignende struktur og udøver en aktivitet sva-
25 rende til aktiviteten af steroider. For eksempel viser den en hæmmende virkning over for plasmin, urokinase, kallikrein, thrombin og komplement. På den anden side er der ikke rapporteret om de fysiologiske aktiviteter af den sidstnævnte forbindelse. I modsætning hertil
30 har forbindelserne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse og farmaceutisk acceptable salte deraf en antikomplementær aktivitet, der er uventet bedre end aktiviteten af glycyrrhizin, som det vil fremgå af resultaterne ved de nedenfor beskrevne farmakologiske tests,
35 og som er ganske uventet set i forhold til 3-O-(6-O-methyl- β -D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B.

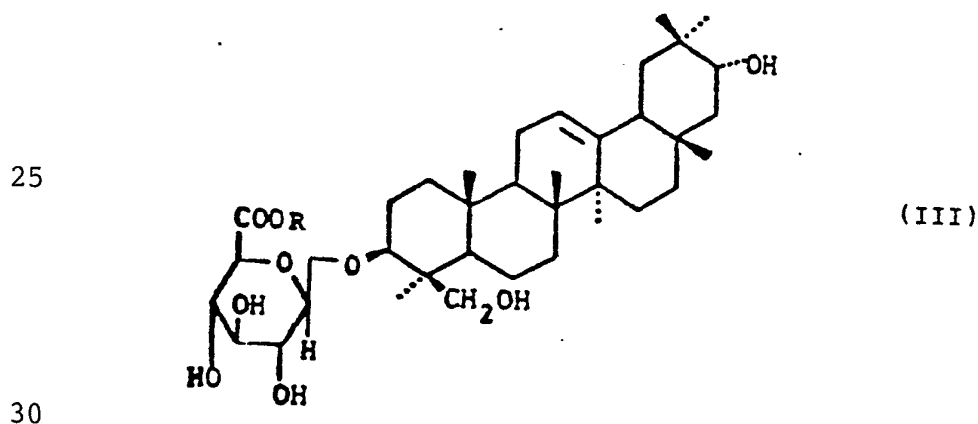
De hidtil ukendte sojasapogenol-derivater har²
formlen (I)



eller er farmaceutisk acceptable salte med baser af soja-
sapogenol-derivatet med formlen (I), hvilke salte vindes
ved at omsætte sojasapogenol-derivatet med passende ba-
15 siske forbindelser.

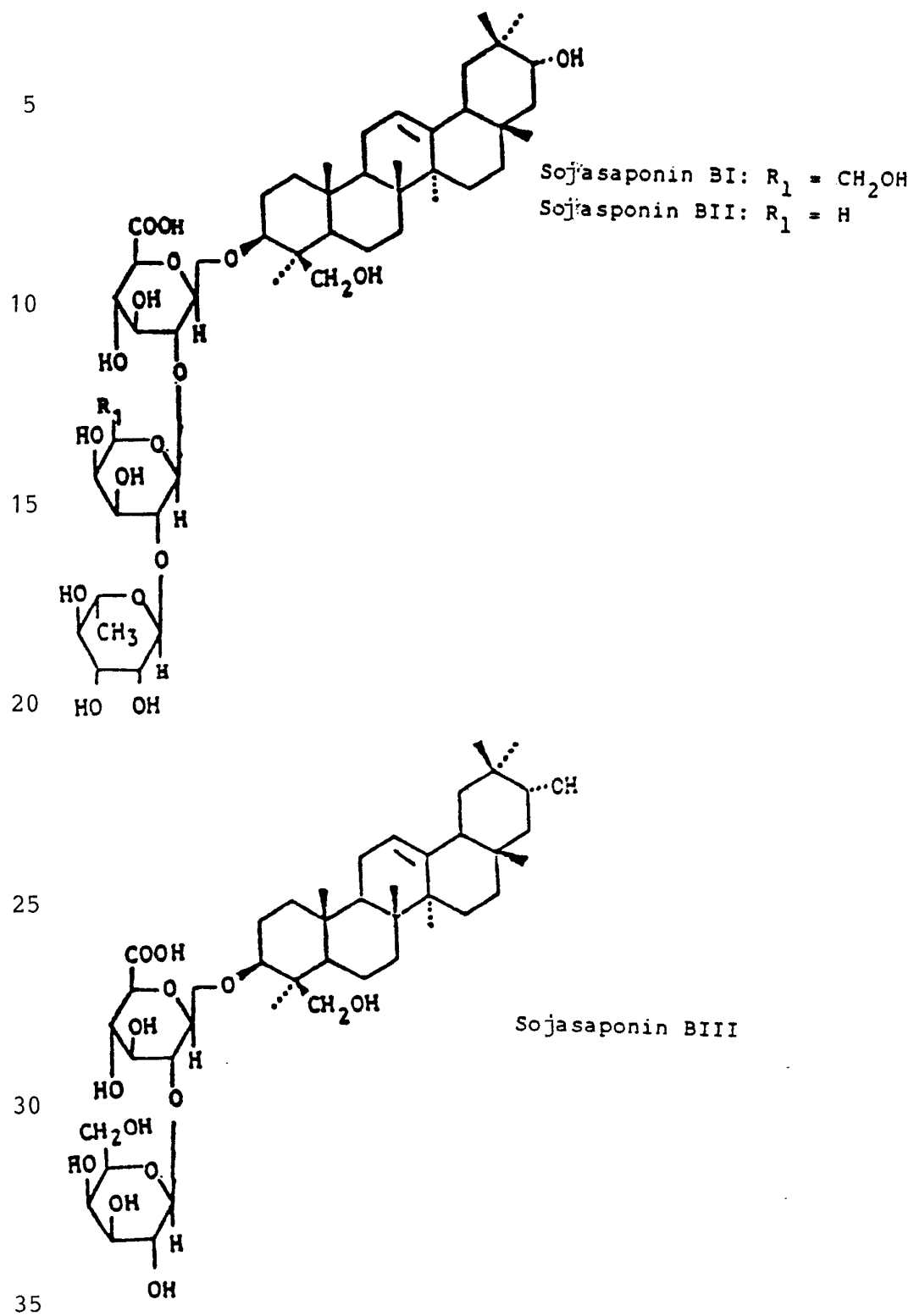
Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling
af 3-O-(β -D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B eller
farmaceutisk acceptable salte deraf er ejendommelig ved,
at

20 a) en 3-O-(6-O-alkyl- β -D-glucuronopyranosyl)-soja-
sapogenol B med den almene formel (III)



hvor R er en lavere alkylgruppe, hydrolyseres, eller

b) sojasaponin B, der består af sojasaponin B-kom-
ponenterne I, II og III med formlerne



underkastes partiel hydrolyse i vand eller et vandigt opløsningsmiddel i nærværelse af en stærk uorganisk eller stærk organisk syre, og forbindelsen med formlen (I) isoleres fra det partielle hydrolysat,

- 5 og at, om ønsket, en opnået forbindelse med formlen (I) overføres i et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

Farmaceutiske kompositioner indeholdende en terapeutisk effektiv mængde af sojasapogenol-derivatet med formlen (I) eller farmaceutisk acceptable salte deraf
10 med baser kan anvendes til opnåelse af antikomplementær aktivitet hos dyr, navnlig til behandling af nephritiske forstyrrelser hos dyr, ved at den farmaceutiske komposition indgives en patient, der lider af en sådan forstyrrelse.

- 15 Forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen kan anvendes til at lindre eller forebygge patologiske reaktioner, der kræver funktion af et komplement, og ved den terapeutiske behandling af immunologiske sygdomme, såsom rheumatoid arthritis, systemisk lupus erythematosus, glomerulonephritis, autoallergisk hæmolytisk anæmi,
20 blodpladeforstyrrelser eller vasculitis. Forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen kan også anvendes ved den terapeutiske behandling af ikke-immunologiske sygdomme, såsom paroxysmal nocturnal hæmoglobinuria, arveligt angioneurotisk ødem og inflammatoriske tilstande induceret ved indvirkning af bakterielle eller lysosomale enzymer på de pågældende komplementkomponenter, såsom inflammation efter coronar occlusion. De kan også anvendes ved behandling af transplantations-udstødninger og som blodkultur- og
25 -transport-medier.
30

- I de senere år er der foretaget omfattende undersøgelser vedrørende den teoretiske analyse af komplementsystemet og dets virkninger på mennesker og dyr, og på nuværende tidspunkt er det den almindelige opfattelse,
35 at når visse forbindelser har en antikomplementær aktivitet, kan de udvise terapeutiske virkninger på forskel-

lige symptomer beskrevet ovenfor. For eksempel er følgende (her i dansk oversættelse) angivet i U.S.-patentskrift nr. 4.021.544:

"Betegnelsen "komplement" refererer til en kompleks gruppe af proteiner i legemsvæsker der, i samarbejde med antistoffer eller andre faktorer, spiller en vigtig rolle som mediatorer for immune, allergiske, immunokemiske og/eller immunopatologiske reaktioner. Reaktionerne, hvori et komplement deltager, finder sted i blodserum eller i andre legemsvæsker og betragtes derfor som humorale reaktioner."

"Hvad angår menneskeblod, er der på nuværende tidspunkt mere end 11 proteiner i komplementsystemet. Disse komplementproteiner betegnes ved bogstavet C og ved tal: C1, C2, C3 osv. op til C9. Komplementproteinet C1 er i virkeligheden en samling af underenheder betegnet C1q, C1r og C1s. Det tal, der er givet komplementproteinerne, har relation til den rækkefølge, hvori de bliver aktive, med undtagelse af komplementprotein C4, der reagerer efter C1 og før C2. Talangivelserne for proteinerne i komplementsystemet blev valgt, før reaktionsfølgen var fuldt forstået. En mere detaljeret diskussion af komplementsystemet og dets rolle i legemsprocesser findes i for eksempel Bull. World Health Org., 39, 935-938 (1968), Scientific American, 229, (Nr. 5), 54-66 (1973), Medical World News, Oktober 11, 1974, side 53-58, 64-66, Harvey Lectures, 66, 75-104 (1972), The New England Journal of Medicine, 287, 489-495, 545-549, 592-596, 642-646 (1972), The John Hopkins Med. J., 128, 57-74 (1971), og Federation Proceeding, 32, 134-137 (1973)."

"Komplementsystemet kan betragtes som bestående af tre undersystemer: (1) en genkendelsesenhed (C1q), der sætter det i stand til at kombinere med antistofmolekyler, der har fundet en fremmed indtrænger, (2) en aktiveringsenhed (C1r, C1s, C4, C2, C3), der forbereder en position på nabomembranen, og (3) en angrebsenhed (C5, C6, C7, C8 og C9), der skaber hul i membranen. Membran-

angrebsenheden er ikke-specifik. Den ødelægger kun indtrængere, fordi den er udviklet i deres nærhed. For at begrænse skade på værtsorganismens egne celler til et minimum, skal enhedens aktivitet være tidsmæssigt begrænset. Denne begrænsning opnås delvis ved den spontane nedbrydning af aktiveret komplement og delvis ved interferens fra inhibitorer og destruktive enzymer. Komplementkontrollen er imidlertid ikke perfekt, og der er tilfælde, hvor der er sket skade på værtsorganismens celler.

10 Immunitet er derfor et dobbeltægget sværd."

"Aktivering af komplementsystemet accelererer også blodstørkning. Denne virkning fremkommer via den komplement-betingede frigøring af en størkningsfaktor fra blodplader. Det biologisk aktive komplementfragment og de biologisk aktive komplementkomplekser kan blive involveret i reaktioner, der skader værtsorganismens celler, og disse patogene reaktioner kan resultere i udvikling af immun-komplekse sygdomme. Ved nogle former af nephritis beskadiger komplementet for eksempel nyrens basale membran, hvilket resulterer i, at protein undslipper fra blodet og går over i urinen. Sygdommen dissemineret lupus erythematosus hører til denne kategori. Dens symptomer inkluderer nephritis, viscerale læsioner og hududslæt. Behandlingen af diphteritis eller tetanus med injektion af store mængder antitoxin resulterer undertiden i serumsygdом, en immun-kompleks sygdom. Rheumatoid arthritis involverer også immun-komplekser. Ligesom dissemineret lupus erythematosus er det en autoimmun sygdom, hvor sygdomssymptomerne skyldes patologiske virkninger af immun-systemet hos værtsorganismens væv. Alt i alt er det påvist, at komplementsystemet er involveret ved inflammation, koagulering, fibrinolyse, antistof-antigenreaktioner og andre metaboliske processer."

15
20
25
30

"I nærværelse af antistof-antigen-komplekser er komplement-proteinerne involveret i en række reaktioner, der kan føre til irreversibel membranbeskadigelse, hvis de forekommer i nærheden af biologiske membraner. Mens

35

komplementet udgør en del af legemets forsvarsmekanisme over for infektion, resulterer det således også i inflammation og vævsbeskadigelse ved den immunopatologiske proces. Arten af visse af komplement-proteinerne, formodnings-
5 ger vedrørende metoden ved komplementbinding til biologiske membraner og den måde, hvorpå komplement bevirker membran-beskadigelse, er diskuteret i Annual Review in Biochemistry, 38, 389 (1969)."

"Det er rapporteret, at de kendte komplement-inhibitorer, epsilon-aminocaprinsyre, Suramin Sodium og tranexamsyre, har været anvendt med held ved behandlingen af arveligt angioneurotisk ødem, en sygdomstilstand, der skyldes en arvet mangel eller svigtende funktion af serum-inhibitoren af den aktiverede første komponent af komplementet (C1-inhibitor), The England Journal of Medicine, 286, 808-812 (1972); Allergol, Et. Immunioath., II, 163-168 (1974); J. Allergy Clin. Immunol., 53, nr.5, 298-302 (1974), og Annals of Internal Medicine, 84, 580-593 (1976)."

20 3-O-(β -D-glucuronopyransyl)-sojasapogenol B vundet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen viser virksom antikomplementær aktivitet. Forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen forventes derfor at inhibere overdreven aktivering af komplement ved sådanne sygdomme, som
25 betegnes "immunkomplekse sygdomme" eller "autoimmune sygdomme", for eksempel nephritis, rheumatiske sygdomme eller systemisk lupus erythematosus, og at være effektive ved forebyggelse og behandling af sådanne sygdomme.

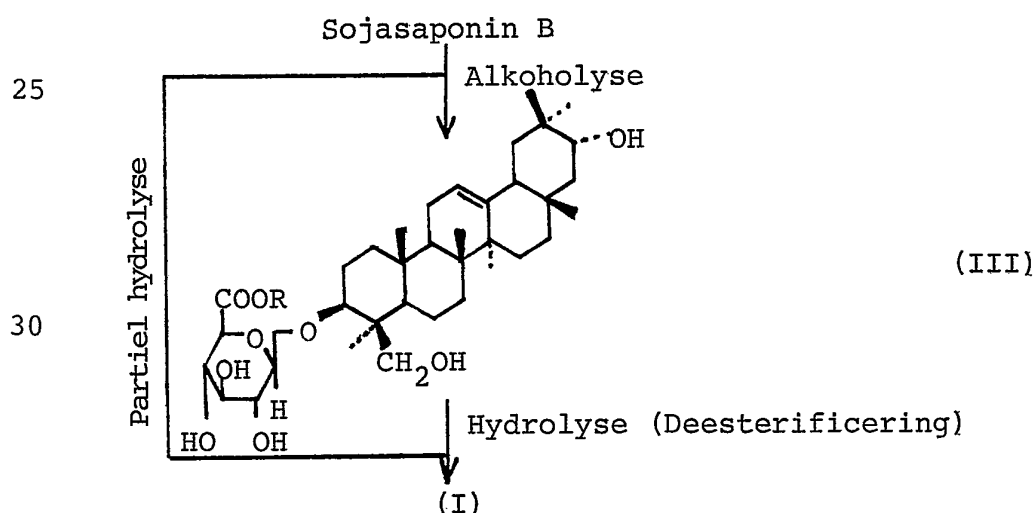
Til brug ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen
30 til fremstilling af de omhandlede forbindelser kan kendt saponin-holdigt plantemateriale, såsom sojabønne, der indeholder forbindelser med en 3-O-(β -D-glucuronopyransyl)-sojasapogenol-del som en partiel struktur, underkastes kemiske behandlinger eventuelt sammen med fysiske behandlinger. For eksempel kan man først fraskille
35 sojasaponin B fra sojabønner og derefter behandle denne forbindelse ifølge Reaktionsskema 1, der er omtalt nærmere nedenfor.

Fraskillelsen af sojasaponin B kan foregå ved hjælp af i og for sig kendte fraskillelses-processer og -midler. Eksempler på egnede kemiske behandlinger omfatter hydrolyse, alkoholyse, etherificering og acylering. Eksempler på egnede fysiske behandlinger omfatter opløsningsmiddel-ekstraktion, opløsningsmiddelfortynding, væskechromatografi, gaschromatografi og omkrystallisation.

Mere specifikt kan forbindelsen med formelen (I) fremstilles ved, at sojasaponin B vundet ved fremgangsmåden ifølge Kitagawa et.al. (Isao Kitagawa, Masayuki Yoshikawa og Ischiro Yoshioka, Chem.Pharm.Bull., 22, side 1339 (1974), Ibid., 24, side 121 (1976), underkastes alkoholyse med en lavere alkohol, såsom methanol, ethanol, propanol, isopropanol, butanol, pentanol eller hexanol, i nærværelse af en syre til dannelse af 3-O-(6-O-alkyl- β -D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B, der derefter hydrolyseres (Reaktionsskema 1).

Ved angivelsen "sojasaponin B" skal der her forstås en blanding af sojasaponiner I, II og III, der indeholder sojasapogenol B som et aglycon, som beskrevet i ovennævnte litteratursteder.

Reaktionsskema 1.



I ovennævnte formel (III) repræsenterer R en lavere alkylgruppe med 1-6 C-atomer.

Forskellige syrer, der er almindeligt anvendt ved alkoholyse, kan anvendes ved alkoholysen af sojasaponin

5 B. Egnede eksempler på sådanne syrer omfatter stærke uorganiske syrer, såsom hydrogenhalogenider, f.eks. hydrogenchlorid eller hydrogenbromid, svovlsyre eller salpetersyre, stærke organiske syrer, såsom trichlor-

10 eddikesyre, og Lewis-syrer, såsom aluminiumchlorid, bortrifluorid, titantetrachlorid eller titantetrabromid.

Alkoholysen kan fortrinsvis gennemføres ved fra rumtemperatur til ca. 150°C, navnlig ved fra 50°C til 100°C, over et tidsrum på fra 1 til 6 timer.

15 Fremgangsmåden til isolering af forbindelserne repræsenteret ved formlen (III) fra reaktionsblandingen er ikke særligt begrænset, og der kan anvendes forskellige i og for sig kendte fremgangsmåder, der gør brug af de fysisk-kemiske egenskaber af de fremstillede stoffer,

20 omfattende de, der benyttes ved fraskillelse af sojasaponin B. Egnede eksempler på sådanne fremgangsmåder omfatter en fremgangsmåde, der gør brug af forskellene i opløselighed mellem produkterne og urenhederne, en fremgangsmåde, der gør brug af forskellene i adsorptionsevne

25 og affinitet for almindelige adsorbentier, såsom aktiveret carbon, XAD-2 (handelsnavn), silicagel, ionbytterharpikser eller "Sephadex"® en fremgangsmåde, der gør brug af forskellene i fordelingskoefficient mellem to væskefaser, og en kombination af sådanne fremgangsmåder. For eksempel blandes

30 alkoholsatet med vand til dannelse af udfældninger, der underkastes silicagel-chromatografi og elueres trinvis med et elueringsmiddel, f.eks. en blanding af chloroform og ethanol, for at isolere forbindelsen med formlen (I).

Hydrolysen af forbindelsen med formlen (III) kan

35 sædvanligvis gennemføres i et inert opløsningsmiddel i nærværelse af en katalysator under betingelser, der er sædvanligt anvendt ved hydrolyse af estre. Sæd-

vanlige katalysatorer kan anvendes ved denne reaktion. Egnede eksempler på katalysatorer, der kan anvendes, omfatter mineralsyrer, såsom saltsyre, svovlsyre eller salpetersyre, og uorganiske basiske forbindelser, såsom
5 natriumhydroxid, kaliumhydroxid, natriumcarbonat, natriumbicarbonat, kaliumcarbonat eller kaliumbicarbonat. Uorganiske basiske forbindelser foretrækkes som katalysator.

Der kan ved ovennævnte reaktion anvendes hvilke
10 som helst sædvanlige inerte opløsningsmidler. Egnede eksempler på inerte opløsningsmidler omfatter vand, lavere alkoholer, såsom methanol, ethanol eller propanol, ethere, såsom dioxan eller tetrahydrofuran, dimethylsulfoxid eller dimethylformamid, eller en blanding
15 af disse. Hydrolysureaktionen kan fortrinsvis gennemføres ved fra rumtemperatur til ca. 150°C, navnlig fra 50°C til 110°C, over en periode på fra 1 til 6 timer.

Forbindelsen med formlen (I) kan isoleres fra produkter fra partiel hydrolyse af sojasaponin B, hvor
20 hydrolyse er gennemført i vand eller et vandigt opløsningsmiddel, indeholdende ét eller flere af de ovennævnte opløsningsmidler, i nærværelse af en stærk uorganisk syre, såsom et hydrogenhalogenid, f.eks. hydrogenchlorid eller hydrogenbromid, svovlsyre eller salpetersyre,
25 eller en stærk organisk syre, såsom trichloreddikesyre eller trifluoreddikesyre. Angivelsen "partiel hydrolyse" skal her betyde hydrolyse, ved hvilken der ikke sker nogen fraspaltning af aglyconet fra den som udgangsmateriale anvendte saponin B.

30 Isoleringen af forbindelsen fra det partielle hydrolysat kan gennemføres under anvendelse af de ovenfor beskrevne isoleringsmetoder. For eksempel kan det partielle hydrolysat, efter at det er ekstraheret med n-butanol for at fjerne vandopløselige komponenter,
35 underkastes silicagelsøjlechromatografi for at opdele

det i respektive komponenter, og fraktionen svarende til 3-O-(β -D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B underkastes krystallisation af et egnet opløsningsmiddel, f.eks. en blanding af chloroform og acetone (volumenforhold 1:1). Den partielle hydrolyse kan sædvanligvis gennemføres ved fra rumtemperatur til ca. 150°C, fortrinsvis fra 50°C til 110°C, over en periode på fra 1 til 6 timer.

Den ifølge opfindelsen fremstillede forbindelse kan danne salte med forskellige farmaceutisk acceptable basiske forbindelser.

Eksempler på egnede basiske forbindelser, der kan anvendes til dannelse af de ovennævnte salte, omfatter uorganiske basiske forbindelser, for eksempel natriumhydroxid, kaliumhydroxid, aluminiumhydroxid, natriumcarbonat, kaliumcarbonat eller natriumbicarbonat, og organiske basiske forbindelser, for eksempel piperazin, morpholin, piperidin, ethylamin, dimethylamin eller triethylamin.

Forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen kan anvendes som et middel til behandling af nephritis, og når de anvendes til dette formål, foreligger de i farmaceutiske kompositioner sammen med sædvanlige farmaceutisk acceptable bærere. Egnede bærere, der kan anvendes, er for eksempel fortyndingsmidler eller excipienser, såsom fyldstoffer, strækmidler, bindemidler, befugtningsmidler, disintegrationsmidler, overfladeaktive midler og smøremidler, der er sædvanligt benyttede ved fremstilling af sådanne lægemidler alt efter dosisformen.

Forskellige dosisformer for de terapeutiske midler som et behandlingsmiddel for nephritis kan vælges alt efter formålet med behandlingen. Typiske dosisformer, der kan anvendes, er tabletter, piller, pulvere, flydende præparater, suspensioner, emulsioner, granuler, kapsler, suppositorier og injicerbare præparater (opløsninger, emulsioner, suspensioner).

Ved formning af en farmaceutisk komposition, indeholdende forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen som aktiv bestanddel, til tabletform kan der anvendes mange forskellige på området kendte bærere. Eksempler på egnede bæ-
5 re omfatter sådanne excipiensersom lactose, hvidt sukker, natriumchlorid, glucose, urinstof, stivelse, calciumcarbonat, kaolin, krystallinsk cellulose og kieselsyre, bindemidler, såsom vand, ethanol, propanol, simpel sirup, glucose, stivelsesopløsning, gelatineopløsning,
10 carboxymethylcellulose, shellac, methylcellulose, kaliumphosphat og polyvinylpyrrolidon, disintegrationsmidler, såsom tørret stivelse, natriumalginat, agarpulver, laminariapulver, natriumbicarbonat, calciumcarbonat, Tween, natriumlaurylsulfat, stearinsyremonoglycerid,
15 stivelse og lactose, disintegrationsinhibitorer, såsom hvidt sukker, stearinsyreglycerylester, kakaosmør og hydrogenerede olier, absorptionsfremmende midler, såsom kvaternære ammoniumbaser og natriumlaurylsulfat, befugtningsmidler, såsom glycerol og stivelse, adsorp-
20 tionsmidler, såsom stivelse, lactose, kaolin, bentonit og kolloidal kieselsyre, og smøremidler, såsom rensed talkum, stearinsyresalte, borsyrepulver, Macrogol og fast polyethylenglycol.

Ved formning af den farmaceutiske komposition til
25 pilleform kan der anvendes mange forskellige af de på området kendte sædvanlige bærere. Eksempler på egnede bærere er excipiensersom glucose, lactose, stivelse, kakaosmør, hærkede vegetabiliske olier, kaolin og talkum, bindemidler, såsom gummi arabicum-pulver, tragacanth-
30 pulver, gelatine og ethanol, og disintegrationsmidler, såsom laminaria og agar. Tabletterne kan, om ønsket, være belagte og gjort til sukkerbelagte tabletter, gelatinebelagte tabletter, belagte enteriske tabletter, filmbelagte tabletter eller tabletter belagt med to
35 eller flere lag.

Ved formning af den farmaceutiske komposition til suppositorieform kan der anvendes mange forskellige på området kendte bærere. Eksempler på egnede bærere omfatter polyethylenglycol, kakaosmør, højere alkoholer, 5 estre af højere alkoholer, gelatine og semisyntetiske glycerider.

Når den farmaceutiske komposition oparbejdes til et injicerbart præparat, bliver den resulterende opløsning og suspension fortrinsvis steriliseret og er isotonisk i forhold til blodet. Ved fremstilling af den 10 farmaceutiske komposition i form af en opløsning eller suspension kan alle på området sædvanligt benyttede fortyndingsmidler benyttes. Eksempler på egnede fortyndingsmidler er vand, ethylalkohol, propylenglycol, 15 ethoxyleret isostearylalkohol, polyoxyethylensorbitol og sorbitanestre. Natriumchlorid, glucose eller glycerol kan inkorporeres i et terapeutisk middel, f.eks. som et middel til behandling af nephritis, i en mængde, der er tilstrækkelig til at fremstille isotoniske opløsninger. Det terapeutiske middel kan yderligere indeholde sædvanlige hjælpestoffer, puffere, smertestillende midler og konserveringsmidler og eventuelt farvende midler, parfumer, smags/duft-stoffer, sødemidler og andre lægemidler.

25 Den mængde af forbindelsen fremstillet ifølge opfindelsen, der skal inkorporeres som aktiv bestanddel i en farmaceutisk komposition, der kan anvendes som behandlingsmiddel for nephritis, er ikke kritisk og kan variere over et vidt område. En egnet terapeutisk effektiv 30 mængde af forbindelsen fremstillet ifølge opfindelsen ligger sædvanligvis fra 1 til 70 vægtprocent, fortrinsvis fra 5 til 50 vægtprocent, baseret på den totale komposition.

Der er ingen særlig begrænsning med hensyn til anvendelsesmåden for det terapeutiske middel som et antikomplementært middel, såsom et middel til behandling 35 af nephritis, og det terapeutiske middel kan indgives ad veje, der er egnet for de foreliggende former af det terapeutiske middel. For eksempel bliver tabletter,

piller, flydende præparater, suspensioner, emulsioner, granuler og kapsler indgivet oralt. De injicerbare præparater indgives intravenøst enten alene eller sammen med sædvanlige hjælpemidler, såsom glucose og aminosy-
5 rer. Endvidere kan det terapeutiske middel, om ønsket, indgives intramuskulært, intracutant, subcutant eller intraperitonealt. Suppositorier indgives intrarectalt.

Dosen af midlet til behandling af nephritis vælges passende efter formålet med anvendelsen, symptomerne
10 osv.. En dosis af forbindelsen fremstillet ifølge opfindelsen ligger sædvanligvis fra ca. 0,5 til ca. 20 mg/kg legems-
vægt pr. dag.

Forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen har anti-
komplementære aktiviteter og er også anvendelige som terapeu-
15 tiske midler for autoimmune sygdomme, kollagensygdomme og reumatiske sygdomme.

Resultaterne af tests vedrørende de farmakologiske virkninger af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen er anført nedenfor.

20 Farmakologisk testning.

1. Testforbindelser.

A. 3-0-(β -D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B (fremstillet ifølge opfindelsen).

B. Glycyrrhizin (Sammenligning).

25 2. Antikomplementær aktivitet.

Den antikomplementære aktivitet af ovennævnte testforbindelser blev målt og bekræftet ved test-
metoden beskrevet i Meneki Kagaku (Immuno-Chemistry),
Yuichi Yamamura et al., Ed. Asakura Shoten, Tokyo,
30 Japan (1973), side 830-834. Nærmere angivet blev der i et forsøgsrør indført 0,5 ml af en vandig dispersion af hver af testforbindelserne, 0,5 ml af sensibiliserede erythrocyter (EA) indeholdende 1×10^8 celler/ml, 1 ml af en 5-gange fortyndet opløsning af veronal-
35 pufferopløsning indeholdende isotonisk gelatine (denne

5-gange fortyndede opløsning betegnes for kortheds skyld GVB⁺⁺) og 0,5 ml komplementserum (marsvinekomplement) fortyndet 150 gange med nævnte GVB⁺⁺. Blandingen holdtes ved 37°C i 60 minutter. Derefter blev der til-

5 sat 5 ml af en iskold fysiologisk saltopløsning, og blandingen blev centrifugeret. Absorption af den fraskilte supernatant målt ved OD₄₁₃, og den grad, hvori testforbindelsen hæmmede hæmolyse af de sensibiliserede erythrocyter, blev bestemt. Aktiv-

10 vitetsværdien for 50% hæmolysehæmning (γ/ml) målt ved ovennævnte metode er i nedenstående tabel I anført for hver testforbindelse.

3. Akut toxicitet.

Den akutte toxicitet (LD₅₀ mg/kg) af testfor-

15 bindelserne blev bestemt på mus ved intraperitoneal indgift i tilfælde af Forbindelse A og ved intravenøs indgift i tilfælde af Forbindelse B.

De opnåede resultater er anført i nedenstående tabel I

20

Tabel I		
Testforbindelse	Antikomplementær aktivitet	Akut toxicitet LD ₅₀
	(γ/ml)	(mg/kg)
A	5	over 300
25 B	500-1.000	over 300

Som det fremgår af resultaterne anført i tabel I, er den akutte toxicitetsværdi (LD₅₀) for den ifølge opfindelsen fremstillede forbindelse af en størrelsesorden, der til-

30 lader at anvende forbindelsen som et terapeutisk middel.

4. Terapeutisk effekt på nephritis af nephrotoxin-type.

Rotte-nephrotoxin (kort betegnet "NT") vandtes, som nedenfor beskrevet.

Rottenyre cortex blev homogeniseret med samme

35 mængde fysiologisk saltopløsning. Den homogeniserede blanding blev blandet med Freund's complete adjuvant

(et produkt fra Difco Company) i et volumenforhold på 1:1. Af den resulterende blanding blev 2 ml injiceret intramuskulært i en kanin (legemsvægt 3.100 g) for at immunisere kaninen. Halvanden måned senere blev der taget blod fra hjertet af kaninen, og der vandtes serum. Det resulterende serum blev inaktiveret ved 56°C i 30 minutter, derefter udsaltet med en 40% mættet vandig opløsning af ammoniumsulfat og fraktioneret. γ -Globulinfraktionen (IgG-fraktion) blev opsamlet for at vinde NT.

Den terapeutiske vurdering foregik ved anvendelse af han-Wistarrotter med en legemsvægt på 150-160 g med tre grupper for hver testforbindelse. Testforbindelsen blev indgivet intraperitonealt én gang hver 24 timer i 7 dage. Én time efter indgiften af testforbindelsen på den tredje dag blev der anvendt NT. NT blev injiceret intravenøst i en mængde på 1 ml ved en halevene på hver rotte. Fysiologisk saltopløsning anvendtes som kontrol.

Proteinuria-niveauet (total mængde udskilt i urinen over en periode på 24 timer) målt ved hjælp af turbidometri under anvendelse af oksealbumin som kontrol ved hjælp af sulfosalicylsyre.

De opnåede resultater er anført i nedenstående tabel II.

25

Tabel II

Proteinuria-niveau (mg/døgn)

		Dag-tal			
		<u>1</u>	<u>4</u>	<u>7</u>	<u>10</u>
30	Kontrol 1	14	17	22	32
	2	20	25	27	37
	3	12	19	20	31
	Gennemsnit	15	20	23	33
35	Forbindelse fremstillet ifølge opfindelsen (3 mg/legeme) 1	1,9	1,2	0,9	7
	2	5,3	2,9	1,8	13
	3	2,5	2,7	1,1	9
	Gennemsnit	3,2	2,3	1,3	9,7

Ovennævnte dag-tal er talt fra den indgift af testforbindelsen, der foregik 1 time før anvendelsen af NT.

Proteinuria-niveauet hos en sund rotte er 0,5-5 mg/døgn. Når proteinuria-niveauet overstiger dette område, navnlig når proteinuria-niveauet er over 10 mg/døgn, kan det med sikkerhed siges, at der foreligger nephritis. Som det fremgår af resultaterne i tabel II, forekom der nephritis hos kontrolgruppen, og efter indgivelse af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen er mængden af proteinuria fra tidspunktet for indgift af NT til 10 døgn efter indgift i det væsentlige den samme som hos en sund rotte. Indgiften af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen ses således at hæmme primære og sekundære immunreaktioner.

5. Terapeutiske effekter på nephritis af Heymann-type.

Han-Wistarrotter med en legemsvægt på 180-200 g anvendtes ved testen. Rottenyrecortex blev udtaget og homogeniseret med samme volumenmængde af en fysiologisk saltopløsning. Homogenatet blev centrifugeret ved 1.500 G i 1 time. Supernatantvæsken blev rensat ved metoden ifølge T.S. Edginton et al., Journal of Experimental Medicine, 127, 555 (1968), og blandet med Freund's complete adjuvant 37 Ra (et produkt fra Difco Company) i et volumenforhold på 0,4:1. Den resulterende blanding blev injiceret intraperitonealt på isolerede rotter i en mængde på 0,5 ml pr. rotte. Derefter blev samme mængde af denne blanding indgivet hver 2 uger, indtil proteinuria-niveauet oversteg 100 mg/døgn. (Denne periode var ca. 6-8 uger).

Hver af testforbindelserne blev indgivet intraperitonealt på rotter angrebet af nephritis af Heymann-type (med en legemsvægt på 300-350 g) én gang pr. dag i 7 dage, og derefter blev mængden af proteinuria (mg/døgn) målt på samme måde, som ovenfor beskrevet. Fysiologisk saltopløsning anvendtes som kontrol. De opnåede resultater er anført i nedenstående tabel III.

Tabel III
Proteinuria-niveau (mg/døgn)

			Dag-tal					
			Før indgift	1	4	7	14	21
5	Kontrol	1	132	127	135	126	135	114
		2	121	105	121	109	103	105
		3	135	117	137	132	121	109
	Gennemsnit		129	116	131	122	119	109
10	Forbindelse frem- stillet ifølge opfindelsen (3 mg/legeme)	1	117	89	42	27	3	8
		2	129	127	75	39	17	13
		3	123	119	58	18	9	7
	Gennemsnit		123	112	58	28	3	9

15 To til tre uger efter testningens begyndelse steg rotternes legemsvægte til 400-500 g, og normale proteinuria-niveauer menes at ligge på 5-15 mg/døgn. Som det fremgår af resultaterne i tabel III, kan forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen helbrede nephritis af

20 Heymann-type.

Nedenfor er anført eksempler på gennemførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen og kompositionseksempler på midler til behandling af nephritis indeholdende forbindelser fremstillet ifølge opfindelsen.

25

Eksempel 1
(Fremgangsmåde a)

(i) Sojasaponin B (500 mg) blev opløst i 30 ml methanol. Efter tilsætning af 1,5 ml af en 15N svovlsyre blev opløsningen tilbagesvalet i 3,5 timer. Koldt vand blev sat til reaktionsblandingen til dannelse af et bundfald, der blev indsamlet og vasket tilstrækkeligt med vand. Bundfaldet blev adsorberet på en silicagelsøjle og fremkaldt med en blanding af chloroform-ethanol (succes-

30 sivt volumenforhold 20:1 200 ml, volumenforhold 10:1 150 ml, volumenforhold 5:1 200 ml og volumenforhold 2:1

35

200 ml), hvorved vandtes 71 mg 3-O-(6-O-methyl- β -D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B.

- (ii) Den herved vundne forbindelse blev opløst i 2 ml methanol, og der blev til opløsningen sat 2 ml af en 5 1N vandig NaOH-opløsning, hvorefter der blev tilbage-svalet i 2 timer. Efter at reaktionsblandingen var blandet med koldt vand, og pH-værdien var indstillet på ca. 1 med en 1N vandig HCl-opløsning, blev blandingen ekstraheret med n-butanol. n-Butanol-fraktionen blev 10 koncentreret til tørhed under reduceret tryk. Krystallisation af inddampningsresten af en blanding af chloroform-acetone (volumenforhold 1:1) gav 50 mg 3-O-(β -D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B.

Smp.: 231-232°C (dek.)

- 15 Elementæranalyse for $C_{36}H_{58}O_9$:

	<u>C</u>	<u>H</u>
Beregnet (%):	68,11	9,21
Fundet (%):	67,85	9,08

- 20 Silicagel-tyndtlagschromatografi under anvendelse af "Kiesel Gel F₂₅₄" (handelsnavn for et produkt fra Merck Co.):

1. Chloroform-methanol-vand (65:35:8 efter volumen) $R_f = 0,38$
- 25 2. Isopropanol-2N vandig ammoniakopløsning (100:15 efter volumen) $R_f = 0,21$.

- Opløselighed: meget opløselig i methanol, ethanol, n-propanol, n-butanol, vandig alkaliopløsning, pyridin, dimethylsulfoxid og dimethylformamid, opløselig i acetone, ethylacetat og methylethylketon og sparsomt 30 opløselig i benzen, chloroform, diethylether, n-hexan og petroleumsether.

Eksempel 2

(Fremgangsmåde a)

(i) Sojasaponin B (500 mg) blev opløst i 30 ml ethanol
5 mættet med hydrogenchlorid, og opløsningen blev tilbage-
svallet i 3 timer. Koldt vand blev sat til reaktionsblan-
dingen til dannelse af bundfald, der blev indsamlet og
vasket med vand. Bundfaldet blev derefter rensset ved
silicagelsøjlechromatografi (elueringsmiddel: chloro-
10 form-ethanol (20:1, 10:1, 5:1 og 2:1 efter volumen)),
hvorved vandtes 75 mg 3-O-(6-O-ethyl- β -D-glucuronopyra-
nosyl)-sojasapogenol B.

(ii) Den herved vundne forbindelse blev blandet med
2 ml ethanol og 2 ml af en 1N vandig KOH-opløsning, og
15 blandingen blev tilbagesvallet i 2 timer. Reaktionsblan-
dingen blev blandet med koldt vand, og pH blev indstil-
let til ca. 1 med en 1N vandig HCl-opløsning efterfulgt
af ekstraktion med n-butanol. n-Butanol-fraktionen blev
inddampet til tørhed under reduceret tryk, og krystal-
20 lisation af inddampningsresten af en blanding af chloro-
form-acetone (1:1 efter volumen) gav 45 mg 3-O-(β -D-
glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B.

Smp. 231-232°C (dek.).

25

Eksempel 3

(Fremgangsmåde b)

Sojasaponin B (1 g) blev opløst i 70 ml destille-
ret vand, og opløsningen blev blandet med 5 ml af en
30 15N vandig svovlsyreopløsning efterfulgt af tilbagesva-
ling i 2,5 timer. Reaktionsblandingen blev ekstraheret
med n-butanol. n-Butanol-fraktionen blev koncentreret
til tørhed under reduceret tryk. Inddampningsresten
blev adsorberet på en silicagel-søjle og fremkaldt med
35 en blanding af chloroform-ethanol (20:1, 10:1, 5:1 og
2:1 efter volumen), hvorved vandtes 350 mg
3-O-(β -D-glucuronopyranosyl)-sojasapogenol B.

Smp. 231-232°C (dek.).

Kompositionseksempel 1

	Natriumsalt af forbindelsen	
	fremstillet ifølge opfindelsen	500 mg
5	Glucose	250 mg
	Destilleret injektionsvand	til totalmængde
		på 5 ml

Natriumsaltet og glucose blev opløst i destilleret injektionsvand, og opløsningen blev hældt i en 5 ml ampul. Den atmosfæriske luft blev fjernet med nitrogen, og ampullen blev opvarmet ved 121°C i 15 minutter for at sterilisere opløsning og vinde et injicerbart præparat.

15 Kompositionseksempel 2

Forbindelse fremstillet ifølge opfindelsen 750 mg
Semi-syntetisk glyceridbase til ialt 2000 mg
Forbindelsen fremstillet ifølge opfindelsen blev sat til den semisyntetiske glyceridbase, og de blev blandet og suspenderet ved 50°C. Blandingen blev støbt i en form og henstillet til naturlig afkøling. Produktet blev fjernet, hvorved vandtes en suppositorie.

Kompositionseksempel 3

25	Forbindelse fremstillet ifølge opfindelsen	150 g
	Avicel [®] (varemærke for et produkt fra Asahi Kasei Kabushiki Kaisha)	40 g
	Majsstivelse	30 g
	Magnesiumstearat	2 g
30	TC-5 (varebetegnelse for hydroxypropylmethylcellulose)	10 g
	Polyethylenglycol	3 g
	Ricinusolie	40 g
	Methanol	40 g

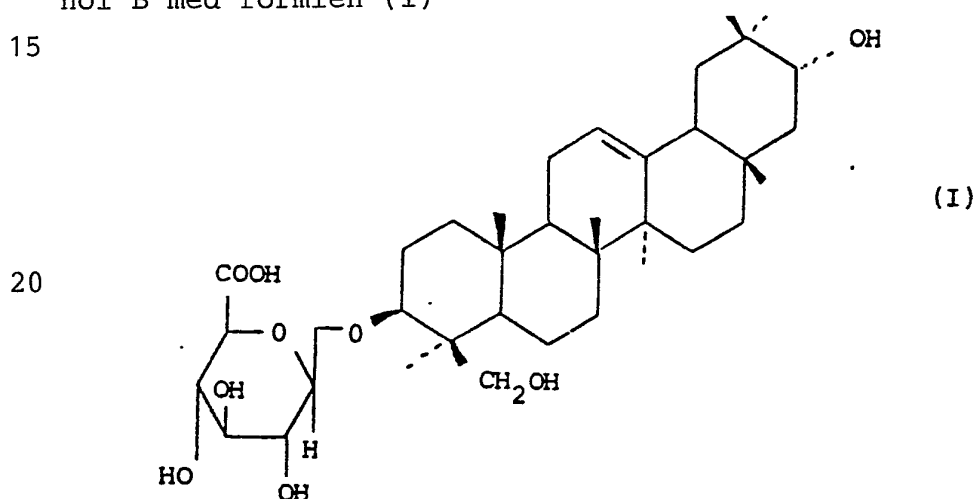
Forbindelsen fremstillet ifølge opfindelsen, Avicel[®],
 majsstivelse og magnesiumstearat blev blandet og formalet og
 derefter tabletteret under anvendelse af en sædvanlig
 5 stampemaskine (R 10 mm) til sukkerbelægning. De resul-
 terende tabletter blev belagt med et filmbelægnings-
 middel sammensat af TC-5, polyethylenglycol 6000, rici-
 nusolie og methanol til dannelse af filmbelagte table-
 ter.

10

P A T E N T K R A V

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af tera-
 apeutisk aktivt 3-O-(β -D-glucuronopyranosyl)-sojasapoge-
 nol B med formlen (I)

15



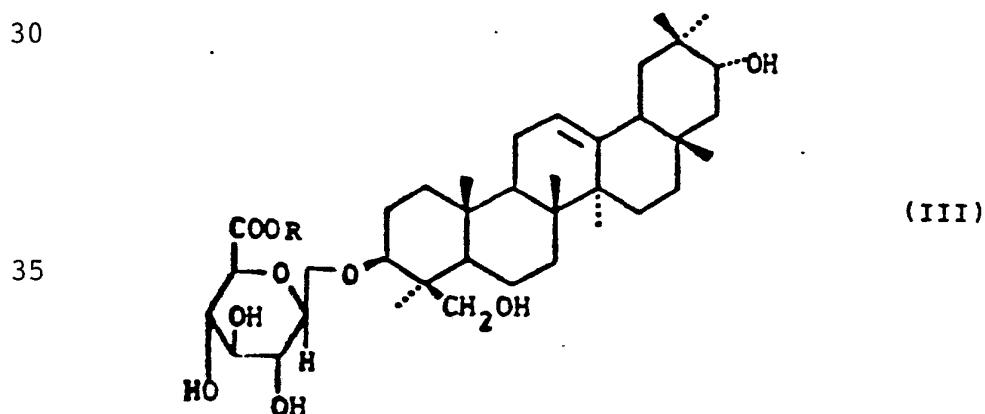
20

25

eller farmaceutisk acceptable salte deraf med baser,
 k e n d e t e g n e t v e d , a t

a) en 3-O-(6-O-alkyl- β -D-glucuronopyranosyl)-soja-
 sapogenol B med den almene formel (III)

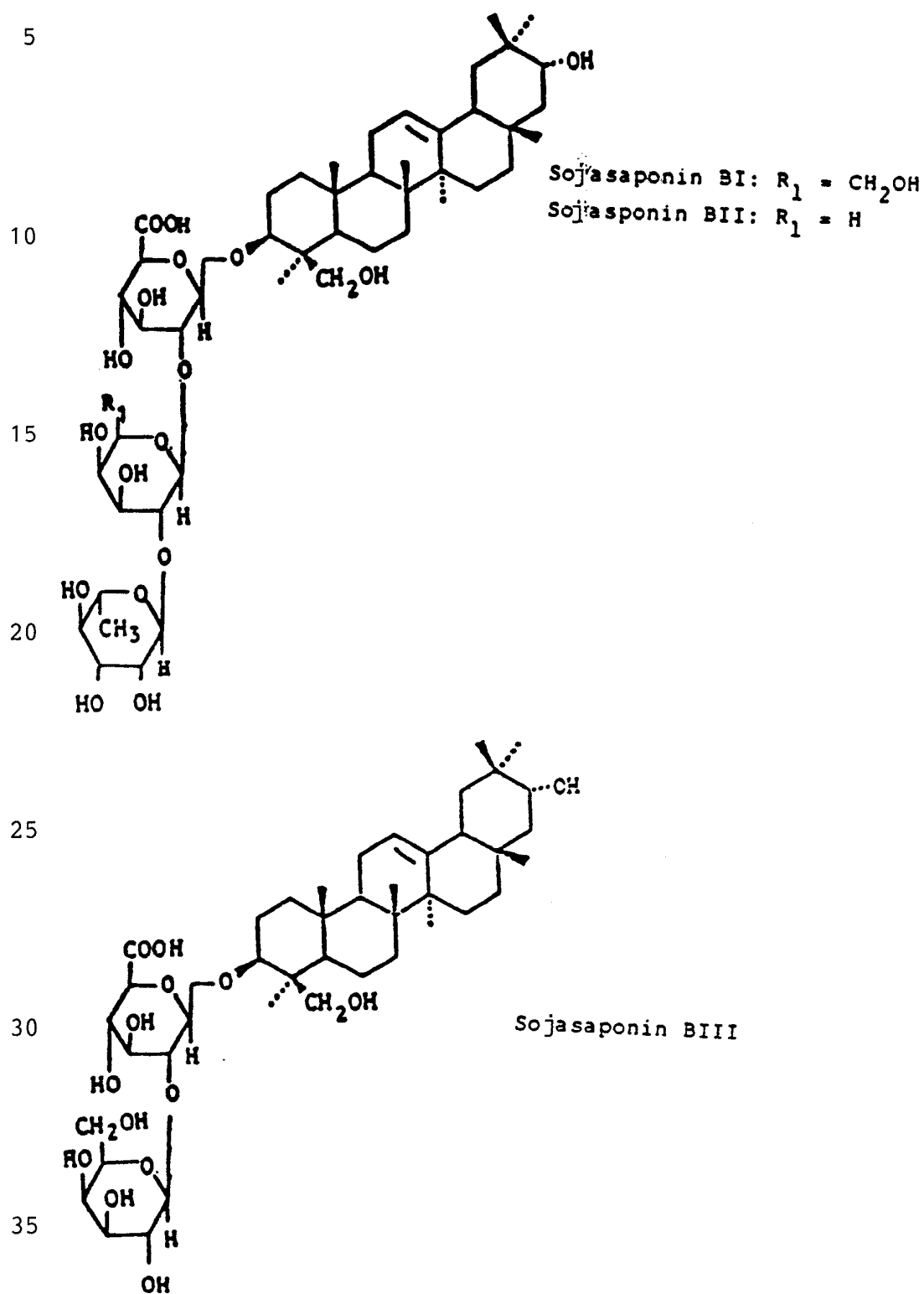
30



35

hvor R er en lavere alkylgruppe, hydrolyseres, eller

b) sojasaponin B, der består af sojasaponin B-komponenterne I, II og III med formlerne



underkastes partiel hydrolyse i vand eller et vandigt opløsningsmiddel i nærværelse af en stærk uorganisk eller stærk organisk syre, og forbindelsen med formlen (I) isoleres fra det partielle hydrolysat,

5 og at, om ønsket, en opnået forbindelse med formlen (I) overføres i et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1 a), k e n d e - t e g n e t ved, at hydrolysen gennemføres i et inert opløsningsmiddel i nærværelse af en katalysator.

10 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 a) eller 2, k e n - d e t e g n e t ved, at hydrolysen gennemføres ved en temperatur på fra rumtemperatur til ca. 150°C, fortrinsvis fra 50 til 110°C.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 b), k e n d e -
15 t e g n e t ved, at den partielle hydrolyse gennemføres ved en temperatur på fra rumtemperatur til ca. 150°C, fortrinsvis fra 50 til 110°C.